

利用SCIEX LC-MS/MS系统结合甲醇衍生法定量测定硫酸软骨素和硫酸皮肤素

SCIEX Tandem Mass Spectrometry Method for Quantification of Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate by Methanolysis Derivatization

荆莲艳, 李国庆

Jing Lianyan, Li Guoqing

Keywords: Chondroitin Sulfate, Dermatan Sulfate, Methanolysis Derivatization, LC-MS/MS

Abstract

Here we report on an alternative high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for measurement of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. This method describes the quantification of derivatized dimers chemically derived from DS and CS. Dried urine samples are derivatized using methanolic HCl. These products are dried and mixed with internal standards that are deuterio-labeled dimers prepared by deuteriomethanolysis of CS standards. The CS and DS-derived dimers are individually quantified by comparing the signals of the GAG-specific dimer products with the internal standard, and conversion to concentration by means of calibration curves. The accuracy and precision values for all QC samples of DS and CS-derived dimers met the acceptance criteria. This validated HPLC-MS/MS method was successfully applied to the quantitation of DS and CS.

引言

糖胺聚糖 (GAGs) 是一类广泛存在于细胞表面和细胞基质中带负电荷的长链多糖, 主要由重复二糖单元组成。硫酸软骨素 (CS) 是由葡萄糖醛酸 (GlcA) 和乙酰氨基半乳糖 (GalNAc) 通

过 $\beta 1 \rightarrow 3$ 糖苷键交替连结而成的二糖聚合物, 分子量在 50 ~ 140 kDa 之间。硫酸皮肤素 (DS) 是硫酸软骨素 (CS) 中的部分己糖醛酸 (GlcA) 被差向异构化为艾杜糖醛酸 (IdoA) 以后形成。粘多糖蓄积症 (MPS) 是一组罕见的遗传性疾病, 其原因是降解糖胺聚糖 (GAG) 所需的一种或多种溶酶体酶缺乏^[1]。GAG 在患者体液和组织中的逐渐累积最终导致严重的神经和生理损伤^[2]。因此, 人们越来越感兴趣地对新生儿和老年患者进行筛查, 作出诊断, 尽早治疗^[3]。

因为 GAG 的极性很高, GAG 很容易被排出体外, 可以通过尿液中 GAG 的分析筛选 MPS 患者。目前临床上通常采用分光光度法测定患者的总 GAG, 而后采用凝胶电泳进行分离, 以确定哪种 GAG 代谢异常。虽然这些方法成本低、简单易行, 但缺乏敏感性和特异性, 无法检测未受疾病影响的单独 GAG, 因此难以确定参考范围。

本试验建立一种 LC-MS/MS 分别测定 DS 和 CS 浓度, 并考查准确性和精密度, 该法操作简单, 专一性强, 灵敏度高, 以期用于临床粘多糖蓄积症筛查。

实验部分

1、样品前处理办法

参照 Zhang et al.^[4] 的方法, 取 25 μ L 样品, 30°C 氮气吹干, 依次加入 200 μ L 3N 盐酸甲醇溶液, 封膜, 65°C 反应 60min。室温冷却 (不超过 5min), 30°C 氮气吹干, 用 200 μ L 初始流动相复溶, 加入 5 μ L 内标工作液 [²H]₆CS 二聚体 100 μ g/mL, 混匀, 进样量 1 μ L, LC-MS/MS 分析。

2、检测方法

色谱条件：色谱柱使用飞诺美Kinetix C8 Column (2.1×100mm, 2.6 μm)进行分离，流动相选用5mM乙酸铵水溶液作为A相，和甲醇作为B相，柱温设为40℃，进样量1 μL，进行梯度洗脱，总液相时间3.5 min。

质谱条件：采用电喷雾离子源（Electrospray Ionization, ESI）和多反应监测（Multiple Reaction Monitoring, MRM）模式质谱检测。离子源参数：加热气（GS1）和辅助加热气（GS2）分别为50和55 psi，脱溶剂气温度为500℃；气帘气（Curtain Gas, CUR）为30 psi，碰撞气（Collision Gas, CAD）为9 psi；喷雾针（Ionspray, IS）正模式电压为+ 5500V。为了获取较好的稳定性和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压（Declustering Potential, DP）和碰撞电压（Collision Energy, CE），目标物定量离子对、定性离子对以及内标物监测离子对等参数均经过系统优化，离子对信息见表1。

表1. DS-二聚体和CS-二聚体及内标物MRM离子通道参数

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell (msec)	ID	DP (V)	CE (V)
426	236.1	50	CS-1	84	13
426	394.1	50	CS-2	84	15
426.1	236	50	DS-1	83	13
426.1	204	50	DS-2	83	22
432.1	239	50	CS-IS	83	13

结果与讨论

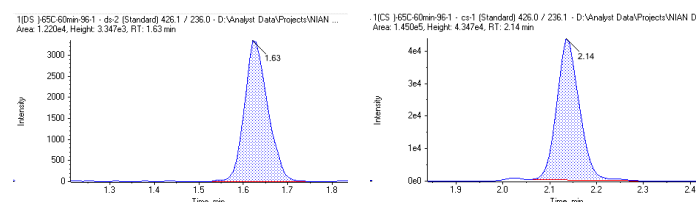


图1. DS-二聚体和CS-二聚体提取色谱图

DS-二聚体和CS-二聚体回归方程和线性范围（见表2和图2）见表4，r均大于0.995，DS-二聚体和CS-二聚体在5~500 μg/ml浓度范围内线性良好。

表2. CS和DS-二聚体回归方程和线性范围

测定项目	线性范围 (μg/mL)	回归方程(相关系数r)
CS-二聚体	5~500	$Y=0.79929X+0.35495$ ($r=0.99962$)
DS-二聚体	5~500	$Y=0.02271X+0.00350$ ($r=0.99779$)

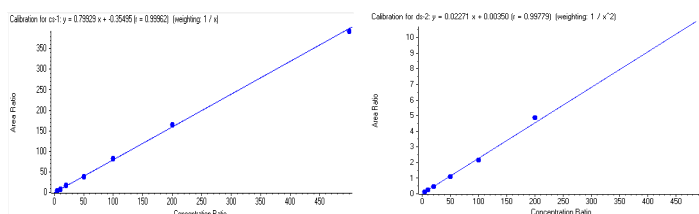


图2. DS-二聚体和CS-二聚体回归方程

为了考察方法的重现性及准确性，分别进行CS和DS-二聚体精密密度(RSD)和准确度方法验证。从表3可以看出，低质控和高质控的精密密度（RSD）均在9.12%以内，回收率均在87.37%~101.86%之内。

表3. CS和DS-二聚体精密密度(RSD)和准确度(n=6)

Component Name	Actual Concentration (μg/mL)	Mean (μg/mL)	Percent CV%	Accuracy %
CS-二聚体	15	15.279	9.12	101.86
	250	232.988	5.46	93.2
DS-二聚体	15	15.157	5.54	101.05
	250	218.415	2.21	87.37

总结

本方法使用SCIEX Triple Quad™ 液相色谱串联质谱系统为高灵敏度和高稳定性的三重四极杆质谱系统。本方法采用ESI+电喷雾离子源和MRM多反应监测模式，可对CS和DS-二聚体进行快速的定量分析。该方法具有、特异性高、线性好、准确度高优点，以期用于临床粘多糖蓄积症筛查检测。

参考文献

- [1] E. Neufeld, J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.
- [2] J. Muenzer, The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations.
- [3] H. Zhou, P. Fernhoff, R.F. Vogt, Newborn bloodspot screening for lysosomal storage disorders.
- [4] H Zhang, S P Young, D S Millington. Quantification of glycosaminoglycans in urine by isotope-dilution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. [J]. Current Protocols in Human Genetics.

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12355-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](#)